



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08140678 A**

(43) Date of publication of application: 04 . 06 . 96

(51) Int. Cl.

C12N 15/09
C07H 21/04
C07K 14/715
C12N 5/10
C12P 21/02
/(C12N 5/10 , C12R 1:91), (C12P
21/02 , C12R 1:91)

(21) Application number: 06280655

(22) Date of filing: 15 . 11 . 94

(71) Applicant: **TANPAKU KOGAKU
KENKYUSHO:KK**

(72) Inventor: **OTA YOSHIMI
HIRAOKA OSAMU
ANAGUCHI HIROYUKI**

(54) **DNA CODING FOR PROTEIN OF
LIGAND-BONDING REGION CONTAINING CRH
REGION OF GRANULOCYTE COLONY
STIMULATING FACTOR RECEPTOR**

the amino acid sequence containing the ligand-bonding region.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO

(57) Abstract:

PURPOSE: To obtain the subject new DNA coding for a protein of a ligand- bonding region containing a region complementary to a cytokinin receptor of a granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) receptor and giving a protein useful e.g. for the treatment of G-CSF-dependent diseases.

CONSTITUTION: This new DNA codes for a protein of a ligand-bonding region containing a region complementary to a cytokinin receptor of a granulocyte colony stimulating factor(G-CSF) receptor having an amino acid sequence containing the amino acid sequence of the formula and useful e.g. for the production of a G-CSF receptor protein useful for the research of diseases relating to the mutual action of G-CSF receptor and a ligand and the treatment and prevention of G-CSF-dependent diseases or abnormalities such as leukemia caused by the abnormal proliferation of granulocyte. The DNA can be produced from a plasmid containing the gene of human G-CSF receptor by treating the plasmid with restriction enzymes and cloning by PCR method using the N- terminal and C-terminal primer of

ATG	GTA	GGG	CTG	GGA	GCC	TGC	ACC	CTG	ACT	GGA	GTT	ACC	CTG	ATC	TTC	48
Met	Val	Gly	Leu	Gly	Ala	Cys	Thr	Leu	Thr	Gly	Val	Thr	Leu	Ile	Phe	
1			5					10				15				
TTC	CTA	CTC	CCC	AGA	AGT	CTG	GAG	AGC	TGT	GGA	CAC	ATC	GAG	ATT	TCA	96
Leu	Leu	Leu	Pro	Arg	Ser	Leu	Gln	Ser	Cys	Gly	His	Ile	Glu	Ile	Ser	
			20					25				30				
ACC	CTA	CAC	ATC	GCA	TGC	ATG	CCG	TCA	TCT	CTG	CCT	GGA	TTC	TGG	AGC	960
Thr	Leu	Gln	Met	Arg	Cys	Ile	Arg	Ser	Ser	Leu	Pro	Gly	Phe	Trp	Ser	
305				310						315					320	
CCC	TGG	AGC	CCC	GGC	CTG	CAG	CTG	AGG	CCT	ACC	ATG	AAG	GCC			1002
Pro	Trp	Ser	Pro	Gly	Leu	Gln	Leu	Arg	Pro	Thr	Met	Lys	Ala			
			325						330							

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-140678

(43) 公開日 平成8年(1996)6月4日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A			
C 0 7 H 21/04		B		
C 0 7 K 14/715		8318-4H		
		9281-4B	C 1 2 N 15/ 00	Z N A A
		7729-4B	5/ 00	B
審査請求 有 請求項の数11 O L (全 17 頁) 最終頁に続く				

(21) 出願番号 特願平6-280655

(22) 出願日 平成6年(1994)11月15日

(71) 出願人 000149974

株式会社蛋白工学研究所

大阪府吹田市古江台6丁目2番3号

(72) 発明者 太田 由己

大阪府吹田市五月が丘東8番 D-402

(72) 発明者 平岡 修

大阪府吹田市五月が丘東7番13 アルタカ
一サA-304

(72) 発明者 穴口 博之

大阪府高槻市古曾部町1-11-12 東レ高
槻アパート136号

(74) 代理人 弁理士 青山 葆 (外2名)

(54) 【発明の名称】 顆粒球コロニー刺激因子受容体のCRH領域を含むリガンド結合領域の蛋白質をコードしているDNA

(57) 【要約】

【目的】 G-CSFと結合活性を有する蛋白質の製造。

【構成】 G-CSF受容体のリガンド結合領域の内、CRH領域、およびIg-CRH領域の蛋白質をコードしているDNA、該DNAを多角体プロモーターの下流に組み込んでなる組換え型バキュロウイルス、該ウイルスにより昆虫細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養し、組換え蛋白質を製造する方法、およびこのようにして製造された蛋白質。

【効果】 G-CSF受容体とリガンドとの相互作用に関連する疾患の研究、G-CSF依存性の疾患や異常、例えば、顆粒球の増殖の異常に起因する白血病の治療または予防に有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 顆粒球コロニー刺激因子受容体の、サイトカイン受容体相補領域を含むリガンド結合領域の蛋白質をコードしているDNA。

【請求項2】 さらに、イムノグロブリン様領域をも含むリガンド結合領域の蛋白質をコードしている請求項1記載のDNA。

【請求項3】 該蛋白質が配列番号1のアミノ酸番号122-334で示されるアミノ酸配列を含有するものである、請求項1記載のDNA。

【請求項4】 該蛋白質が配列番号1のアミノ酸番号26-334で示されるアミノ酸配列を含有するものである、請求項2記載のDNA。

【請求項5】 請求項1～4のいずれかに記載のDNAを含有する発現ベクター。

【請求項6】 多角体プロモーターの下流に請求項1～4のいずれかに記載のDNAを組み込んでなる組換え型バキュロウイルスである、請求項5記載の発現ベクター。

【請求項7】 図1に記載のAcCRHまたはAcIgr-CRHである請求項4記載の発現ベクター。

【請求項8】 請求項5～7のいずれかに記載の発現ベクターで形質転換された形質転換体。

【請求項9】 昆虫由来の細胞である請求項8記載の形質転換体

【請求項10】 請求項8または9記載の形質転換体を培養し、培養物から組換え生成物を回収することからなる、顆粒球コロニー刺激因子受容体のリガンド結合領域の、サイトカイン受容体相補領域、またはイムノグロブリン様領域およびサイトカイン受容体相補領域の蛋白質を製造する方法。

【請求項11】 請求項9記載の方法で製造された、実質上純粋な、組換え顆粒球コロニー刺激因子受容体のリガンド結合領域蛋白質。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は顆粒球コロニー刺激因子受容体(以下、G-CSF受容体と呼称)の細胞質外領域の内、リガンド結合領域の蛋白質(即ちG-CSF結合領域蛋白質)、さらに詳しくは、サイトカイン受容体相補領域の蛋白質、またはイムノグロブリン様領域およびサイトカイン受容体相補領域の蛋白質をコードするDNA、該DNAを含有する発現ベクター、該ベクターで形質転換された形質転換体、および該形質転換体を適当な培地で培養し、培養物から生成物を回収することからなる、組換え蛋白質の製造方法に関するものである。

【0002】 顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)は血液細胞の増殖と分化に関与するコロニー刺激因子の1員であり好中性顆粒球の増殖および分化に重要な役割を担っている。この因子は、血液中の好中球濃度の制御、並

びに成熟好中球の賦活化に深く関与していることが分かっている。例えば、G-CSFは好中球の前駆細胞等の受容体(G-CSF受容体)を介して該細胞に作用し、その増殖、あるいは分化を刺激して主に好中性顆粒球を与える。また、G-CSFには好中球の調節因子としての作用や、臨床面では、がん患者の化学療法および骨髄移植療法における有用性も示唆されている。他方、骨髄性白血病細胞などのがん細胞の増殖を刺激する場合があることも分かっている。

10 【0003】 G-CSFの作用する細胞は好中球の前駆体および成熟した好中球、および種々の骨髄性白血病細胞に限定されているのに対して、G-CSF受容体は非血液細胞、例えばヒト内皮細胞および胎盤にも存在している。最近の研究では活性発現に際して、同受容体は二量体などの多量体構造をなしていると考えられる。これらのリガンド(つまりG-CSF)とG-CSF受容体との複合体形成反応、また多量体化の機構を解明することは、関連する疾患や異常の研究、治療または予防に有効である。例えば、骨髄性白血病細胞などのがん細胞がG-CSFにより増殖することが示唆されているが、それをG-CSF受容体に拮抗する物質で阻止することが可能である。

【0004】 従って、本発明はG-CSF受容体とリガンドとの相互作用に関連する疾患の研究や治療に有用であり、臨床的に投与した場合には、生体内のG-CSF受容体に対する拮抗作用を通して、G-CSF依存性の疾患や異常、例えば、顆粒球の増殖の異常に起因する白血病の治療または予防にも途を開くものである。

30 【0005】 また、本発明のG-CSF受容体結合領域蛋白質は、ペプチドライブラリーなどを用いてのペプチド性のG-CSFのアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング、非ペプチド性のG-CSFのアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニングを可能にし、G-CSFとG-CSF受容体の結合の研究(その立体構造の解析など)を飛躍的に発展させ、ひいてはG-CSFのアゴニスト、アンタゴニストの合成を可能にするものである。

40 【0006】 現在、G-CSFは、その骨髄性白血病細胞の分化誘導と成熟顆粒球の機能亢進作用に基づき、放射線治療や抗ガン剤治療を受けたガン患者での白血球減少を回復するための治療剤として有用性が期待されているが、上記のG-CSFアゴニストまたはアンタゴニストは、それら白血球減少患者の治療において、G-CSFと同等またはそれ以上の効果を発揮し得ると予想される。

【0007】

【従来技術】 既に、マウスおよびヒト由来のG-CSF受容体をコードするDNAはクローニングされ、配列が明らかにされている[福永ら、Cell, 61 341-350(1990); Proc. Natl. Acad. Sci. US

A. 87 8702-8706(1990); WO91/14776(1991年10月3日公開)。

【0008】福永らは、G-CSF受容体の発現に成功したことを報告しているが(Cell, 前掲; Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 前掲; EMBO J. 10 2855-2865(1991))いずれも相補DNAの全配列を動物細胞を用いて発現させたものであり、その発現量は極めて低く、需要を満たすだけのG-CSF受容体の製造には最適でなく、構造解析、反応機構の研究も十分に行うことができなかった。

【0009】平岡らは、G-CSF受容体のリガンド結合部位の発現に大腸菌マルトース融合蛋白質を用いて成功している(J. Biol. Chem. 269, 22412-22419(1994); 特願平第6-116252)。しかしこの場合には、リガンド結合部位の最小ユニットを取り出したために、天然のG-CSF受容体に比べて、どうしても結合活性の低下が観察された。また同受容体の活性発現に際して生ずるとされる受容体の多量体化は観察されなかった。また精製においてもQ-セファロース、ファクターXa処理などいくつかの段階の処理を必要とした。

【0010】

【発明が解決すべき課題】本発明者らは、上記の様々な目的を達成するためには、G-CSF受容体の全分子の内、特に、G-CSFとの結合および多量体化に必要な領域の蛋白質が有用であることに着目し、そのような蛋白質の有効な製造方法を確立するために研究を重ねてきた。

【0011】本発明の目的に有用なリガンド結合領域蛋白質のアミノ酸配列は、上記文献により、ヒト及びマウス等に関して既知である。即ち、福永らはG-CSF受容体をコードするcDNA(相補DNA)をクローニングし、この受容体はイムノグロブリン様領域(以下Ig領域と略す)、サイトカイン受容体相補領域(以下CRH領域と略す)、フィブロネクチンタイプIII領域からなることを示した(Cell, 前掲; Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 前掲)。

【0012】CRH領域とは、インターロイキン2-7、エリスロポイエチン、成長ホルモン、GM-CSFさらにインターフェロン α , β , γ などのサイトカイン系受容体の細胞質外領域に見られる約200アミノ酸からなる相補性領域で、これらの受容体のリガンド結合部位と考えられている。このことから、これらの受容体はサイトカイン受容体ファミリーと呼ばれている[バザン(Bazan Proc. Natl. Acad. Sci. 6934-6938(1990))。事実、G-CSF受容体でもこのCRH領域が必須であり、現在のところこのCRH領域がこのファミリーのリガンド結合、およびシグナル伝達のために必要な1つのユニットと考えられている。

【0013】このCRH領域はさらにアミノ末端側ドメ

イン(以下BNDメインと略す)およびC末端側ドメインの2つの部分からなり、BNDメインを欠失させると、活性が完全に失われる。このことは、リガンド結合にはBNDメインが最も重要な役割を果たしていることを示唆しているが、BNDメインのみで活性が保持されるか否かは未だ明瞭でなく、例えば成長ホルモンやインターロイキン6受容体の場合には、C末端側ドメインも必要と考えられている。平岡らはこのBNDメインをリガンド結合領域として発現させている(平岡ら, 前掲)。

10 【0014】Ig領域は、G-CSF受容体の他に、サイトカイン受容体ファミリー、中でもインターロイキン3, 5, 6, GM-CSFの受容体などに見られる約100アミノ酸からなる領域で免疫イムノグロブリン様のアミノ酸配列を成していると考えられている。この領域の、それぞれの受容体の機能への役割は不明である。しかしながら、細胞質外領域として、このIg領域とCRH領域(これらをIg-CRHと略す)のみから構成されるG-CSF受容体はシグナル配列を保持して、しかも天然の受容体と同じリガンド結合能力を有している。また、CRH領域のみでも天然のG-CSF受容体よりはリガンド結合能力は低下するが、前掲のBNDメインよりも高いリガンド結合能力を有している。(後述の実施例5および10参照。)

【0015】以上の結果は、本発明におけるリガンド結合領域蛋白質として、CRH領域を含む蛋白質、あるいはCRH領域に加えてIg領域をも含む(Ig-CRH領域)蛋白質が有用であることを示唆しているが、CRH領域またはIg-CRH領域のみで発現させた例はなく、また、CRH領域またはIg-CRH領域のみで、20 どのようなレベルの結合活性を有するか、また多量体化能を有するかも不明であった。これらの課題を解決するためには、G-CSF受容体結合領域として、CRH領域蛋白質またはIg-CRH領域蛋白質を大量に製造する必要がある。

【0016】G-CSF受容体のIg-CRH領域は非常に発現困難と考えられる。その理由として、この結合部位は多くのシステイン残基を含み(マウス由来では14残基、ヒト由来では17残基)、容易にフォールディングをしないことが挙げられる。また、CRH領域については、マウス由来では10個、ヒト由来では12個のシステイン残基を含んでおり、やはり、容易にフォールディングしないために、発現が困難であると考えられる。しかしながら上記の理由によりIg-CRH領域を発現させることが出来れば、発現させた同領域が天然の受容体とほぼ同じ強さの活性を保持するか否か、さらには多量体化能を保持するか否かを明確にすることが出来る。

【0017】上記の理由から、本発明で開示する、G-CSF受容体のリガンド結合領域蛋白質のDNA組換え法による製造は、従来困難であった天然のG-CSF受

容体とほぼ同じ機能を保持する蛋白質をも含む高機能の同受容体の製造への途を開くものである。

【0018】

【課題を解決するための手段】本発明者は、G-CSF受容体のリガンド結合領域、特にCRH領域およびIg-CRH領域をコードする遺伝子を発現するにあたり、昆虫由来のウイルス、バキュロウイルスをベクターとして用い、昆虫由来の細胞を宿主として用いた。その結果として、目的産物を効率よく分泌生産することに成功し、本発明を完成した。

【0019】本発明方法により製造されたG-CSF受容体のIg-CRH領域のリガンド結合領域蛋白質は、後述するように、天然のG-CSF受容体とほぼ同様な強さのリガンド結合活性を示し、さらにリガンドに依存した多量体化能も示した。また、CRH領域も従来のBNDメイン単独よりは高い結合活性を示した。

【0020】本発明は遺伝子操作の手法を用いてG-CSF受容体のリガンド結合領域蛋白質、詳しくは、CRH領域蛋白質またはIg-CRH領域蛋白質を製造するためのものであり、同領域をコードしているDNA断片を、バキュロウイルス由来の遺伝子制御系に組み込んだプラスミッド、該DNAをやはりこの遺伝子制御系のもとに組み込んである組換え型バキュロウイルスベクター、および、同組換え型ウイルスベクターを用い、昆虫細胞を宿主とする成長ホルモンレセプターのホルモン結合領域蛋白質を製造する方法を提供するものである。

【0021】本発明の目的に従い、本明細書で用いる語句を以下に定義する。

【0022】本発明において、G-CSF受容体という語句はヒトを含む天然のあらゆる哺乳動物起源のG-CSF受容体を意味すると共に、遺伝子操作によって作られるそれら天然のG-CSF受容体の変異体も含むものとする。

【0023】G-CSF受容体のリガンド結合領域蛋白質とは、G-CSF受容体の内、G-CSFとの結合に関与する領域を構成する蛋白質を指す。該蛋白質は、G-CSF受容体のリガンド結合領域の内、CRH領域を構成するアミノ酸配列を含有しており、さらには、CRH領域に加えてIg領域をも含んだIg-CRH領域を構成するアミノ酸配列を有する。発明の目的にとっては、天然のアミノ酸配列を有するリガンド結合領域蛋白質のみならず、当業者既知の方法で1またはそれ以上のアミノ酸の変化によって得られる、同様の活性を有する誘導体も有用である。従って、本明細書中、単に、リガンド結合領域蛋白質と言うときは、天然のアミノ酸配列を有する蛋白質のみならず、その誘導体(上記の意味での変異体)をも包含するものとする。

【0024】G-CSF受容体のリガンド結合領域蛋白質をコードするDNAとは、G-CSF受容体の内、G-CSFとの結合に関与する領域を構成するアミノ酸配

列をコードするDNAを指す。該DNAは、G-CSF受容体のCRH領域を含むリガンド結合領域をコードしており、CRH領域とIg領域を含むリガンド結合領域をコードするDNAもこの定義に含まれる。上記の蛋白質に関する定義と同様に、該DNAは天然のリガンド結合領域蛋白質をコードするもののみならず、当業者既知の方法で得られた該蛋白質の誘導体をコードするDNAをも包含する。DNAは、相補DNA、合成DNAのいずれでもよい。

10 【0025】G-CSF受容体のIg-CRH領域とは、イムノグロブリン様領域とサイトカイン受容体相補領域を指し、本明細書では特記しない限り、該領域のタンパク質、その誘導体をも表す。該領域およびそのシグナル配列に対応するアミノ酸配列はマウス[配列表の配列番号1;福永ら, Cell 61, 341-350(1990)]およびヒト[配列表の配列番号2;福永ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87, 8702-8706(1990)]について既知である。シグナル配列とは当該業者であればよく知られているように、細胞外蛋白質が細胞内より細胞外へ分泌する時に必要とするアミノ酸配列である。これは分泌蛋白質のN末端に連結しており、細胞外への蛋白質の分泌に伴い切断除去される。この配列は、配列番号1では1番のメチオニンから25番目のセリン、配列番号2では1番のメチオニンから23番目のロイシンに対応すると考えられている。本明細書では、マウスG-CSF受容体のCRH領域およびIg-CRH領域に対応する領域の相補DNAを用いてリガンド結合領域蛋白質の発現を示したが、合成DNAでもよい。当業者ならば容易に理解するように、コード

20 30 40 50

の異なるDNAであっても、本発明の蛋白質のアミノ酸配列をコードする限り、本発明の範囲に含まれる。また、ヒト由来のものであってもよく、実施例の記載に限定されない。

【0026】配列番号1に記載のアミノ酸配列をコードしている相補DNAはプラスミッドpBLJ17[福永ら, Cell, 61, 341-350(1990)]に組み込まれている。このプラスミッドpBLJ17はFERMBP-3312(寄託日平成2年3月9日)の下で通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている、*Escherichia coli* K12株から入手可能である。

【0027】G-CSF受容体のIg-CRH領域とは、具体的には上記の福永らの開示した配列において、マウスG-CSF受容体では、1番目のシステインから309番目のアラニンに至る部分を指す(配列番号1においては、それぞれ26番目のシステインと334番目のアラニンに相当する)。同様に、ヒトG-CSF受容体では、1番目のグルタミン酸から310番目のアラニン(配列番号2ではそれぞれ24番目のグルタミン酸と333番目のアラニンに相当する)に至る領域とされて

いる。

【0028】また、CRH領域についてはマウスG-CSF受容体では、97番目のチロシンから309番目のアラニンに至る部分を指す(配列番号1においては、それぞれ122番目のチロシンと334番目のアラニンに相当する)。同様にヒトG-CSF受容体では、98番目のチロシンから310番目のアラニン(配列番号2ではそれぞれ121番目のチロシンから333番目のアラニンに相当する)に至る領域とされる。

【0029】しかしながら、CRH領域およびIg-CRH領域の開始部位および終了部位は必ずしも、本発明にとって厳密でなく、該CRH領域およびIg-CRH領域全体の立体構造に大きな影響を与えることはない。その機能が保持されることを条件として、N末端および/またはC末端が、数残基いずれかの方向にずれたもの、あるいは、N末端および/またはC末端に数残基のアミノ酸が付加したものも包含される。現に、Ig-CRH領域のN末端は1番目のアミノ酸はマウスではシステインであるが、アミノ酸の相同性よりこのシステインに対応する残基はヒトでは3番目のシステインとなる。つまり厳密にどこが第1番目のアミノ酸かは完全に決定されたものではない。またC末端に関しては、通常、このような一次構造上の僅かな差異はIg-CRH領域全体の立体構造に大きな影響を与えず、機能は保たれると考えられる。

【0030】また、CRH領域についても、後述の実施例では、Ig-CRH領域全体からIg領域のかなりの部分を欠失したDNA配列(配列番号5に示す)を用いて発現させている。この場合、昆虫細胞中で発現させると、CRH領域に加えてN末端にIg領域由来のアミノ酸配列が残存して発現されることになる。しかしながら、この残存するIg領域部分は昆虫細胞内のプロテアーゼで容易に切断を受け、最終精製物は、チロシンから始まるCRH領域に、数残基のアミノ酸が付加された形の蛋白質となる。これは、CRH領域がそのみでは、きちんとした立体構造を保持しているのに比べてN末端に残存するIg領域のアミノ酸配列のみでは、恐らくは構造を保たず、その結果として、容易に昆虫細胞内のプロテアーゼによって切断されやすい形で存在することに起因すると考えられる。

【0031】さらに、本発明のリガンド結合領域蛋白質をコードするDNAの配列を用い、当業者周知の方法で1またはそれ以上のヌクレオチドの欠失、挿入または置換により修飾することにより、該DNAがコードするリガンド結合領域蛋白質を構成するアミノ酸やペプチドを修飾し、天然のリガンド結合領域蛋白質と同等またはそれ以上の望ましい生物学的特性を有する、ヒト由来の、あるいはその他の哺乳動物由来の、改良されたリガンド結合蛋白質を製造することができる。望ましい性質とは個々の目的により異なるが、高いG-CSFとの結合活

性、G-CSFとG-CSF受容体の結合を阻害する活性等が含まれる。従って、そのような方法で改変されたDNAも本発明の範囲に包含される。

【0032】発現のためには、目的部分を暗号化するDNA断片に、細胞外への分泌産生のための、シグナルペプチド部分をも含有させておけば、作られたリガンド結合領域蛋白質は、細胞外へ分泌される。このシグナル配列は天然のG-CSF受容体遺伝子にも含まれ、マウス受容体では-25番目のメチオニンから-1番目のセリン(配列番号1で1番目のメチオニンから25番目のセリンに相当する)、ヒト受容体では、-23番目のメチオニンから-1番目のロイシン(配列番号2で1番目のメチオニンから23番目のロイシンに相当する)である。後述するマウス受容体の発現では、天然のそれに対応するものを用いているが、昆虫細胞由来、あるいは動物細胞由来の他の蛋白質のシグナル配列も用いることが出来る。

【0033】このG-CSF受容体のリガンド結合領域、特にIg-CRH領域およびCRH領域の蛋白質をコードするDNA断片を、昆虫細胞を宿主として発現させるためには、あらかじめ、このDNA断片を遺伝子発現系と連結しておく必要がある。昆虫細胞の遺伝子発現系としては、昆虫を宿主とするバキュロウイルスの一種である核多角体病ウイルス(Nuclear Polyhedrosis virus: NPV)の発現系が知られており、Autographa Californica NPV(AcNPV)とBombyx mori NPV(BmNPV)の2種類がある。宿主としては、蛾由来の細胞を用いてAcNPVの場合は細胞Spodoptera frugiperda(S. f. 細胞)、あるいはTrichoplusia ni(TN細胞)を、またBmNPVの場合は、細胞Bombyx mori N(BmN細胞)を用いる。両バキュロウイルスは、ともに多角体遺伝子を含み、それは強い多角体プロモーターの支配下にある。従ってこれらのウイルスベクターを用いて発現させる場合には、この多角体プロモーターの下流に所望の遺伝子を挿入した組換え型バキュロウイルスを調製し、これを宿主細胞に感染させた後培養し、目的とする蛋白質を発現させる。この発現ウイルスベクターの調製に際しては、このウイルスが約130キロ塩基対と大きいため、直接、それに目的とする遺伝子を挿入することが出来ない。そこで、実際の手順としては、まず、遺伝子発現制御領域、つまり多角体プロモーターを含む多角体遺伝子部分のみを切り出し、これを大腸菌を宿主とするベクター、例えばpUC8に挿入した転位ベクターを使用する。

【0034】後述のように、転位ベクターとしてはIg-CRH領域の発現では、pAcYM1、CRH領域の発現では、pVL1393を用いているが、類似のベクターは多数あり、これに拘束されるものではない。

【0035】次いで目的とする遺伝子を転位ベクター中の多角体プロモーターの下流へ挿入する。続いてこの目

10

20

30

40

50

的遺伝子を組み込んだ転位ベクターDNAを、野性型バキュロウイルスゲノムDNAと共に昆虫細胞に同時に移入して培養し、昆虫細胞中で、細胞内DNA組換えをおこさせることで組換え型バキュロウイルスを得る。この場合に昆虫細胞へのDNAの移入においても、Ig-CRH領域の発現ではカルシウムリン酸法、CRH領域の発現ではリポフェクチン法を用いているが、本質的に両者に差はない。また、転位ベクターとして移入するバキュロウイルスゲノムDNAについても、Ig-CRH領域の発現では野生型バキュロウイルスゲノムDNA、CRH領域の発現では変異ゲノムDNAであるバキュロゴールドDNAを用いるがその間に本質的な差はない。

【0036】さらに得られた組換え型バキュロウイルスを幼虫に感染させ、幼虫より目的物を抽出する方法もある。本明細書では、AcNPVベクター系を用い、Sf細胞により組換え型バキュロウイルスを得て、さらにそれをTN細胞へ感染し、培養後目的物を培養液および細胞より抽出する方法について述べているが、本発明はこれに限定されるものではない。シグナル配列およびリガンド結合領域蛋白質をコードする遺伝子はポリメラーゼチェーンリアクション法(以下PCRと略す)によって取り出すことが出来る。後述の実施例の中で用いられる大腸菌を用いての遺伝操作法に関しては、成書(Maniatisら(1982)、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory)など最近の多くの実験書に詳述されている。バキュロウイルスおよびその宿主を用いての実験に関しては、成書[SummersとSmith(1987)、A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures., Texas Agricultural Experiment Station Bulletin No. 1555, Texas A&M University]あるいは[前田(1989)、実験医学、7巻、146-151頁]にその手技について詳しい記述がなされている。

【0037】組換え型バキュロウイルスを感染させた宿主細胞は公知のSf-900 IISFM培地(GIBCO)で行うことが出来る。得られた培養液から細胞を除いた後、G-CSFをリガンドとしたアフィニティークラムクロマトグラフィー、ゲル濾過HPLCにかけることにより純粋なG-CSF受容体のリガンド結合領域を得ることが出来る。アフィニティークラムは福永ら(J. Biol. Chem. 265, 14008-14015 (1990))の方法により作成することが出来る。得られた発現産物は、挿入したDNAがコードするアミノ酸配列から予測される分子量より大きい。これは、産物への糖鎖の付加を示すものである。現に糖生合成の阻害剤であるツシカマイシンの存在下では、ほぼアミノ酸配列より予測された分子量の発現産物を得る。

【0038】アフィニティークラムの作成あるいはG-CSF受容体のリガンド結合活性の測定に用いる非放射

能標識のG-CSFに関しては、キリンビール(株)より供与されたものを用いたが、天然のG-CSFあるいは福永ら(J. Biol. Chem. 265, 14008-14015 (1990))に記載された方法で精製されたものも使用出来、ここで記載されたものに限定されない。

【0039】

【実施例】

実施例1 転位ベクターpAcIg-CRHプラスミッドの構築

AcNPVの多角体タンパク質をコードする部分を含む転位ベクターpAcYM1(松浦ら、J. Gen. Virol. (1987), 68, 1233-1250)の多角体プロモーターの下流にG-CSF受容体のリガンド結合領域(以下、Ig-CRH領域と略す)をコードするDNAを挿入する。

【0040】公知のマウスG-CSF受容体のアミノ酸配列[福永ら、Cell, 61, 341-350 (1990)]を基に、本発明のIg-CRH領域蛋白質をコードするDNAを、配列番号1の、G-CSF受容体の26番システインから334番アラニンにコードする蛋白質とし、設計した。このIg-CRH領域の発現において、発現物が培養液中に分泌されるように、Ig-CRH領域をコードするDNAの調製に際しては、さらに以下の付加がなされている。つまり、そのN末端にはシグナル配列に対応する1番メチオニンから25番セリンをコードする配列が連結され、C末端には、蛋白合成の終結コドンTAAが付加されている。該DNA断片を、ベクターpAcYM1に挿入するため、さらにそのN末端側およびC末端側を延長し、その延長部に制限酵素BamHI認識部位が形成されるように工夫されている。

【0041】上記DNA断片の実際の調製にはPCRを使った。具体的には、まず、それぞれ配列番号3及び配列番号4に記載の塩基配列を有するN-末端プライマー及びC-末端プライマーをアプライド・バイオシステム社の380B型DNA合成機を用いて調製する。次いで、2μMのN-末端プライマー、2μMのC-末端プライマーpBLJ17DNA(1ng)、10×反応緩衝液10μl、各0.25mMのdATP、dTTP、dGTP、dCTP溶液、TaqDNAポリメラーゼ0.5μlを加えて最終の量を100μlとする。ここで10×反応緩衝液、dATP、dTTP、dGTP、dCTP、TaqDNAポリメラーゼは宝酒造のGeneAmpのキットのものを使用した。この反応液をDNAサーマルサイクラー(型式PJ2000, 宝酒造)にセットし、94℃, 1分間熱処理; 37℃2分間アニーリング; 72℃, 3分間反応のサイクルプログラムで25回反応を繰り返すことにより目的のDNA断片を合成する。さらに、上記PCR反応液をフェノール処理することにより精製する。その精製DNAのうち約1μgを、0.1M食塩及び10mM塩化マグネシウムを含む50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)

50 μ l及び制限酵素BamH I (宝酒造) 5単位と共に37℃で1時間インキュベートしてDNAを消化する。この消化液をフェノール処理及びエタノール沈澱した後、1%アガロースゲルの電気泳動にかけ、約1 kbpのバンドを切り出し、スプレック-01 (宝酒造) に入れ、-80℃で15分間凍結した後、37℃で5分間インキュベートして融解する。これを5000回転で10分間遠心して、その濾液を回収する。フェノール処理及びエタノール沈澱によって濾液から目的とするDNA断片を取り出す。続いて、上記DNA断片を転位ベクターpAc Y M-1のBamH部位に挿入する。

【0042】具体的には、約1 μ gのpAc YM1 DNAを50 mM食塩及び10 mM塩化マグネシウムを含む10 mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.5) 50 μ lに溶解し、さらにそれぞれ5単位の制限酵素BamH I (宝酒造)を加えて、37℃で1時間インキュベートすることにより、加えたDNAを消化する。次に、フェノール処理及びエタノール沈澱によって目的とするDNA断片を取り出す。これを5 mM塩化マグネシウムを含む0.1 Mトリス塩酸緩衝液(pH 8.0) 50 μ lに溶解して、さらに3単位のアルカリ性ホスファターゼ(アルカリホスファターゼ、E. coli C 75; 宝酒造)を加えて37℃で1時間インキュベートすることにより、DNAの5'に付し、目的とするDNAを取り出す。1%アガロースゲルの電気泳動にかけて大きい方のDNA断片に相当するバンドを切り出し、スプレック-01 (宝酒造) に入れ、-80℃で15分間凍結した後、37℃で5分間インキュベートして融解する。これを5000回転で10分間遠心して、その濾液を回収する。次にフェノール処理及びエタノール沈澱によって濾液から目的とするDNA断片を取り出す。

【0043】続いてこれを上で調製したDNA断片と混合し、1 mMのEDTAを含む10 mMトリス塩酸緩衝液(pH 7.4)を加えて4 μ lとする。これを16 μ lのA液(DNAライゲーションキット; 宝酒造)及び4 μ lのB液(DNAライゲーションキット; 宝酒造)と混合し、16℃で30分間反応させる。さらに、これを100 μ lの大腸菌K12株のコンピテントセルと混合し、0℃で30分間、さらに42℃で2分間インキュベートすることで大腸菌へ移入し、転位ベクターpAc Ig-CRHプラスミッドを構築した。このプラスミッドを導入した大腸菌K12株/pAc Ig-CRHは通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている(受託日: 平成6年11月8日; 受託番号: FERM P-14618)

【0044】**実施例2** 組換え型ウイルスAc Ig-CRHの作成

実施例1で得られたプラスミッドpAc Ig-CRH DNAより組換えバキュロウイルスを作成する。即ち、このプラスミッドDNAを野生型AcNPV DNAとともに、塩化カルシウム-リン酸沈澱法で昆虫細胞に移入

し、該細胞内における組換えにより組換えバキュロウイルスを作成する。その概略を図1に示す。まず野生型バキュロウイルスAcNPVのDNA 1 μ g[AcNPVはM. D. Summers(Department of Entomology, Texas Agricultural Experiment Station and Texas A&M University College Station, Texas, 77843-2475)より入手可能であり、そのDNAの抽出は前田の方法(実験医学Vol 17, No 13, 146-151, 1989)による]とpAc Ig-CRH

10 DNA 25 μ g(塩化セシウム密度勾配法で2回精製したものを)塩化カルシウムを含むHepes(ヘペス)-リン酸緩衝液(pH 7.05)中で、沈澱させる。他方、昆虫細胞*Spodoptera frugiperda* 9(American Type Culture Collection, 12301, Parklawn Drive, Rockville, MD 20852-1776より入手可能、以下S. f. 9. と略す)を10%牛胎児血清を含むグレース培地(ギブコ社)で培養したもの(約1~1.5 \times 10⁶個/2ml)を35mmの細胞培養用シャーレ(ファルコン社3001)に入れて1時間静置し、細胞を培養しておく。次いで、この細胞上清を抜き取り、上記のDNA沈澱物を滴下し、1時間静置する。さらに細胞上清を抜き取り、新たに10%牛胎児血清を含むグレース培地を2ml加えて26.5℃で4日間培養する。得られた培養液には、野生型AcNPVに加えて目的とする組換え型バ

20 キュロウイルスAc Ig-CRHが含まれている。

【0045】この培養液からAc Ig-CRHを取り出すためにブランクアッセイを行う。まず、前記と同様に生育させたS. f. 9細胞(10⁶個/35mmシャーレ)の培地を抜き取り、約4倍から1万倍に希釈した培養液0.1mlを加える。約1時間静置後、培養液を抜き取り、1%アガロース溶液[3%アガロース(低融点シーブランクアガロース、エフ・エムシー社)と10%牛胎児血清を含むグレース培地を1対2で混合し、37℃に保温したもの]を1ml重層する。アガロースの固化後、1mlの10%牛胎児血清を含むグレース培地をさらに重層し、26.5℃で4日間、保温し、ウイルスブランクを生じさせる。生じたブランクの中で、中心が透明なものをピペットの先などでアガロースごとすくい上げ、1mlの10%牛胎児血清を含むグレース培地に懸濁して単離する(野生型ウイルスはブランクの中心に白い濁りがあり、組換え型は、透明である)。透明なブランクが見出しにくい時は、ブランクが判別しやすいように適当な濃度に、もとの培養液を希釈しなおして、ブランクアッセイをやりなおす。ひろい上げた透明ブランクのブランク懸濁液は、それぞれ100倍から1000倍程度に希釈して、その0.2mlを上記と同様な方法でS. f. 9細胞に重層することでブランクアッセイを繰り返し、他の野生型ウイルス等のブランクの混りのないものとする。こうして単離したものが組換え型バキュロウイルスAc Ig-CRHである。

【0046】**実施例3** AcIg-CRHを用いたIg-CRH領域の分泌発現
組換え体ウイルスAcIg-CRHをTN細胞(Invitrogen; HIGH FIVETM CELLS)をSf-900 I I SFM培地(GIBCO社)で225-cm²フラスコ(Coastar)を用いてコンフルエントまで増殖させた後、同培地で10倍に希釈後、27℃で1日培養する。これに組換え型ウイルスAcIg-CRHを添加して(MOI 1~10)18℃で9日間培養して培養液を回収した。

【0047】培養液中へのIg-CRHの分泌産生は、ウエスタンブロット法でも検出出来る。ウエスタンブロット法は成書(続生化学実験講座第1巻、日本生化学全編、東京化学同人)などに記載された方法で行うことが出来る。ここではバイオラッド社のキット(Immun-Blot, Goat Anti-Rabbit IgG(H+L) Alkaline Phosphatase Conjugate)を使用しており、手順もそれに添付されているものに従って行なった。具体的には、SDS-PAGEで培養液(約10μl)を泳動させた後、それをセルロースアセテートメンブレン(Schleicher & Schuell社; BA85)へ転位させる。同メンブレンは抗G-CSF受容体CRH抗体(抗M1血清; 大阪バイオサイエンス研究所の長田氏より供与)を含むトリス緩衝液pH7.5中でインキュベーション後、さらに抗ウサギIgG(H+L)-アルカリホスファターゼコンジュゲートに作用させ、同メンブレン上のバンドとしてIg-CRHを検出する。

【0048】その結果、約45キロダルトンに対応する位置にIg-CRHのバンドが検出され、これは移入したDNAでコードされるアミノ酸配列から予想される値より大きい。これは生産されたIg-CRHに糖鎖が付加されていることを示唆するものであり、実際に、糖鎖の生合成の阻害剤であるツニカマイシンを添加すると、この約45キロダルトンのバンドは消失し、約40-42キロダルトンのバンドが現れる。これは、ほぼアミノ酸配列から予想されるバンドの大きさに対応する。このことは45キロダルトンのバンドには糖鎖が付加していることを裏付けるものである。

【0049】**実施例4** G-CSF受容体のIg-CRH領域の精製
培養液中のG-CSF受容体はG-CSFをリガンドとしたG-CSF-アフィニティーカラムクロマトグラフィーで精製出来る。G-CSF-アフィニティーカラムクロマトグラフィーの作製法は、福永ら[J. Biol. Chem., 265, 14008-14015]に従った。具体的には、10mgのヒトG-CSF(キリンビール社より供与)を0.5M食塩を含む0.1M炭酸水素ナトリウム緩衝液(pH8.0)中で0.4gのAF-Tresyl-Toyopearlゲルレジン(トソー)と混合し、最終液量を約2mlとして、室温で4時間攪拌する。さらに4℃で一

晩攪拌した後、同ゲルレジンに0.5M食塩を含む0.1Mトリス緩衝液(pH8.0)でさらに3時間、室温で攪拌する。最後に、PBSリン酸緩衝化生理食塩水で洗浄することにより作成される。

【0050】即ち、実施例3で調製したAcIg-CRHに感染させた細胞培養液(約1l)をG-CSFアフィニティーカラム(1×5cm)に添加する。添加後、PBSリン酸緩衝化生理食塩水で洗浄し、0.2M食塩を含む0.1Mグリシン塩酸緩衝液で溶出する。溶出蛋白質は、2Mのトリズマ塩基でただちに中和する。次にこれを0.2M食塩を含む20mMリン酸ナトリウム緩衝液で平衡化したゲル濾過HPLC(内径7.6mm×60cm; TSK GEL G3000 SWHPLCカラム、東ソー)に添加して、同緩衝液で溶出する。溶出蛋白質の大部分は85kDaの部分に溶出される。この85kDaのピークはSDS-PAGEでは45kDaの単一のバンドとなり、ウエスタンブロットでも染ることから目的とするIg-CRH領域の二量体と考えられる。またN末端アミノ酸シーケンス法によると、この標品のN末端はCys-Gly-His-Ile-Ser-Pro-Proで、これは福永ら[Cell, 前掲]の示したIg-CRH領域のN末端配列と予想される配列と一致するものであった。また85kDaピークの他に二つの小さなピークが45kDaと200-250kDaの位置に溶出されるが、これらもSDS-PAGEでは単一の45kDaバンドを示し、ウエスタンブロットでも染ることから、Ig-CRH領域蛋白質の単量体(45kDa)と四量体(200-250kDa)であると考えられる。発現量は、0.2mg~0.5mg/lであった。

【0051】**実施例5** Ig-CRH領域の活性測定
精製Ig-CRH領域蛋白質(85kDa)の活性測定を行なった。活性測定は、福永ら[J. Biol. Chem., 265, 14008-14015(1990)]に記載されているスクヤチャードプロット法に若干の修正を加えて行なった。即ち、50μlのPBS中でIg-CRH領域蛋白質、12.5, 25, 50, 100, 250, 500, 1000pM、各濃度の¹²⁵I-G-CSF(アムシャム社)、10%牛胎児血清、0.1%チャップス(CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonic acid; ドーゲン社)を加え、さらに500μM非標識G-CSFの存在下および非存在下での反応液を調製し、室温で90分間反応させる。これにPBS中100μgのγ-グロブリンを含む溶液150μlを加え、さらにPBS中に30%(w/v)ポリエチレングリコール6000を含む溶液200μlを加える。これを0℃で30分間インキュベーションした後、12000回転、30分間遠心して、Ig-CRH・G-CSF複合体を沈澱させる。そして、沈澱中に含まれる¹²⁵I-G-CSFの放射能をγ-カウンター(パッカード社製コブラ)でカウントする。その結果を図2に示す。この結

果は、Ig-CRH領域のリガンド結合活性が二層性を示し、高結合活性は約100pMの解離定数を低結合活性は約2.5nMの解離定数を示した。この高結合活性は、天然の細胞上のG-CSF受容体の示す活性とほぼ同じである。

【0052】**実施例6** Ig-CRH領域の多量体化
Ig-CRH領域蛋白質の多量体化能を測定するため、ゲル濾過HPLCによるIg-CRH・G-CSF複合体の大きさの解析を行なった。まずIg-CRH領域とG-CSFを0.2M食塩を含む20mMリン酸ナトリウム緩衝液中で1:10, 1:1, 1:0.5, 1:0.1, 1:0のモル比で混合し(Ig-CRH領域の濃度は1.6μMに固定)、80μlの混合物としてゲル濾過TSKゲルG3000SWHPLCに添加して溶出した。結果を図3に示す。図から、1:1の量比の時は、200-250kDaの位置に複合体が溶出されることが分かる。量比1:10の時もその位置は変わらない。また、1:0.5, 1:0.1の時は、95kDaの位置にも複合体は溶出された。以上の結果は、リガンドであるG-CSFの添加で二量体としてのIg-CRH領域が四量体化したものを示すものである。

【0053】**実施例7** 転位ベクターpAcCRHプラスミッドの構築

AcNPVの多角体タンパク質をコードする部分を含む転位ベクターpVL1393(Invitrogen社)の多角体プロモーターの下流にG-CSF受容体のCRHリガンド結合領域(以下、CRH領域と略す)をコードするDNAを挿入する。昆虫細胞でCRH領域を発現するDNAとしてはシグナルペプチド領域に続いてCRH領域が連結した形に設計せねばならない。こうしたDNA断片はプラスミッドpBOSΔIg(福永らEMBO. J. 前掲)より容易にPCR法によって得ることが出来る。つまり、このプラスミッド中のG-CSF受容体に対応するDNA断片は、配列番号1のG-CSF受容体のIg-CRH領域内で、30番目のグルタミン酸から109番目のセリンが欠失し、その代わりにグリシンコドンGGCが挿入されている。つまりIg領域の大部分が欠失した結果、シグナル配列に続いて、16アミノ酸配列をへだてたのみでCRH領域と連結した配列となっている。従って本実施例で示すCRH領域を発現するDNA断片として、配列番号5に示される配列を設計した。

【0054】つまり配列番号5に記載の配列では、1番目のメチオニンから29番目のイソロイシまでは26番目のセリン(配列番号1では26番目システイン)を除いては、配列番号1のアミノ酸配列と同じであり、30番目のグリシンに続いて31番目のバリンから255番目のアラニンに至る配列は配列番号1の110番目のバリンから334番目のアラニンと同じである。配列番号1における26番目のシステインは、配列番号5ではセリンに変換されている。プラスミッドpBOSΔIgで

は、Ig領域に存在する4つのシステイン残基のうち3つまでがIg領域の欠失に伴って失われて、26番目のシステインのみが残っており、これが発現に際し、遊離のシステインとしてCRH領域に存在するシステイン残基とSS結合のかけちがいをおこし、発現を阻害すると考えられることから、上記の変換を行った。さらにそのC末端には、蛋白合成の終結コドンTAAが付加されている。該DNA断片を、ベクターpVL1393に挿入するため、さらにそのN末端側およびC末端側を延長し、その延長部にN末端側には制限酵素BamHI、C末端側にはXbaI認識部位が形成されるように工夫されている。

【0055】上記DNA断片の実際の調製にはPCRを使った。具体的には、まず、それぞれ配列番号6及び配列番号7に記載の塩基配列を有するN-末端プライマー及びC-末端プライマーをアプライド・バイオシステム社の380B型DNA合成機を用いて調製する。配列番号7では、26番目のシステインをセリンに改変するために、17番目から19番目の塩基はAGAの配列になっている。次いで、2μMのN-末端プライマー、2μMのC-末端プライマー、pBOSΔIg DNA(1ng)、10×反応緩衝液10μl、各0.25mMのdATP、dTTP、dGTP、dCTP溶液、TaqDNAポリメラーゼ0.5μlを加えて最終の量を100μlとする。ここで10×反応緩衝液、dATP、dTTP、dGTP、dCTP、TaqDNAポリメラーゼは宝酒造のGeneAmpのキットのものを使用した。この反応液をDNAサーマルサイクラー(型式PJ2000, 宝酒造)にセットし、94℃, 1分間熱処理; 37℃2分間アニーリング; 72℃, 3分間反応のサイクルプログラムで25回反応を繰り返すことにより目的のDNA断片を合成する。さらに、上記PCR反応液をフェノール処理することにより精製する。これにより、目的とするDNA断片の上のN末端側が合成される。

【0056】次に配列番号8及び配列番号9に記載の塩基配列を有するN-末端プライマーおよびC末端プライマーを合成し、やはりpBOSΔIgをテンプレートとして同様にPCR反応を行い、目的とするDNA断片のC末端側を合成する。配列番号8には26番目がセリンになるように、第10番目から第11番目の配列はTCTとなっている。次にN末端側DNAとC末端側DNAを混合し、N末端プライマーとして配列番号6のDNA、C末端プライマーとして配列番号9のDNAを加えてもう一度PCR反応を行い精製する。

【0057】その精製DNAのうち約1μgを、0.1M食塩及び10mM塩化マグネシウムを含む50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)50μl及び制限酵素BamHI(宝酒造)5単位とXbaI(宝酒造)5単位と共に37℃で1時間インキュベートしてDNAを消化する。この消化液をフェノール処理及びエタノール沈澱した後、1%ア

ガロースゲルの電気泳動にかけ、約0.8 kbpのバンドを切り出し、スプレック-01(宝酒造)に入れ、-80℃で15分間凍結した後、37℃で5分間インキュベートして融解する。これを5000回転で10分間遠心して、その濾液を回収する。フェノール処理及びエタノール沈澱によって濾液から目的とするDNA断片を取り出す。続いて、上記DNA断片を転位ベクターpVL1393のBamHI部位、XbaI部位に挿入する。

【0058】具体的には、約1μgのpVL1393 DNAを50mM食塩及び10mM塩化マグネシウムを含む10mMトリス塩酸緩衝液(pH7.5)50μlに溶解し、さらにそれぞれ5単位の制限酵素BamHI(宝酒造)およびXbaI(宝酒造)を加えて、37℃で1時間インキュベートすることにより、加えたDNAを消化する。次に、これを1%アガロースゲルの電気泳動にかけて大きい方のDNA断片に相当するバンドを切り出し、スプレック-01(宝酒造)に入れ、-80℃で15分間凍結した後、37℃で5分間インキュベートして融解する。これを5000回転で10分間遠心して、その濾液を回収する。次にフェノール処理及びエタノール沈澱によって濾液から目的とするDNA断片を取り出す。

【0059】続いてこれを上で調製したDNA断片と混合し、1mMのEDTAを含む10mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)を加えて4μlとする。これを16μlのA液(DNAライゲーションキット;宝酒造)及び4μlのB液(DNAライゲーションキット;宝酒造)と混合し、16℃で30分間反応させる。さらに、これを100μlの大腸菌K12株のコンピテントセルと混合し、0℃で30分間、さらに42℃で2分間インキュベートすることで大腸菌へ移入し、転位ベクターpAcCRHプラスミッドを構築した。このプラスミッドを導入した大腸菌K12株/pAcCRHは通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている(受託日:平成6年11月8日;受託番号:FERM P-14617)

【0060】**実施例8** 組換え型ウイルスAcCRHの作成およびそれを用いたCRH領域の発現
実施例1で得られたプラスミッドpAcIg-CRH DNAより組換えバキュロウイルスを作成する。即ち、このプラスミッドDNAを変異型AcNPVゲノムDNAであるバキュロゴールド(Invitrogen社)とともに、リポフェクチン法で昆虫細胞に移入した。具体的には、プラスミッドpAcCRH DNA 1μgとバキュロゴールドDNA(Invitrogen社)100ngを蒸留水で10μlに調整後、4μlの蒸留水とリポフェクチン(BRL社)4μlを混合したもの8μlに少しずつ添加して15分間室温で静置する。

【0061】他方、昆虫細胞Spodoptera frugiperda 9(American Type Culture Collection, 12301, Parklawn Drive, Rockville, MD 20852・1776より入手可能、以下S. f. 9. と

略す)を10%牛胎児血清を含むグレース培地(ギブコ社)で培養したもの(約1~1.5×10⁶個/2ml)を35mmの細胞培養用シャーレ(ファルコン社3001)に入れて1時間静置し、細胞を培養しておく。次いで、この細胞上清を抜き取り、上記のDNA・リポフェクチン混合液を滴下し、1時間静置する。さらに細胞上清を抜き取り、新たに10%牛胎児血清を含むグレース培地を2ml加えて26.5℃で4日間培養する。得られた培養液には、野生型AcNPVに加えて目的とする組換え型バキュロウイルスAcIg-CRHが含まれている。

【0062】この培養液からAcIg-CRHを取り出すためにプラークアッセイを行う。まず、前記と同様に生育させたS. f. 9細胞(10⁶個/35mmシャーレ)の培地を抜き取り、約4倍から1万倍に希釈した培養液0.1mlを加える。約1時間静置後、培養液を抜き取り、1%アガロース溶液[3%アガロース(低融点シーブラークアガロース、エフ・エムシー社)と10%牛胎児血清を含むグレース培地を1対2で混合し、37℃に保温したもの]を1ml重層する。アガロースの固化後、1mlの10%牛胎児血清を含むグレース培地をさらに重層し、26.5℃で4日間、保温し、ウイルスプラークを生じさせる。ひろい上げたプラークのプラーク懸濁液は、それぞれ100倍から1000倍程度に希釈して、その0.2mlを上記と同様な方法でS. f. 9細胞に重層することでプラークアッセイを繰り返す。こうして単離したものが組換え型バキュロウイルスAcCRHである。

【0063】**実施例9** AcCRHを用いたCRH領域の分泌発現、およびCRH蛋白質の精製

この組換え型バキュロウイルスAcCRHを用いて実施例3と同様に、TN細胞を用いてCRHの生産を行うことが出来る。培養液中には、その結果、約29キロダルトンに対応する位置に目的とするCRHのバンドがウエスタンブロットで検出出来る。この約29キロダルトンのCRH領域は実施例4と同様にG-CSFアフィニティカラムで精製することが出来る。そのN末端アミノ酸配列の75%はAsp-Gln-Ala-Glu-Leu、25%はAla-Gly-Tyr-Pro-Proであり、これは配列番号5の35番目のアスパラギン酸と41番目のアラニンに始まる配列に対応する。配列番号5では、1番のメチオニンから25番目のセリンがシグナル配列に対応する。従って、もしもAcIg-CRHを用いた発現と同様にシグナル配列のみが切断された場合には、目的とする43番目から始まるCRH領域に加えて26番目のセリンから42番目のグリシンに対応するIg領域に由来するアミノ酸配列が残存するはずである。しかし、実際の結果は、配列番号5で43番目から始まるCRH領域に加えて8残基と2残基のIg領域部分を含んだ形で目的物が得られたことを示している。これは前述のように、Ig領域に由来する26番目から42番目の配列では完全なIg領域から大きく欠損した配列であるために、こ

れのみでは有意な高次構造を保持しえず、このために容易に昆虫細胞内のプロテアーゼで切断され、その大部分が除去されてしまうためと考えられる。ここにおける発現量は約10mg/lであった。

【0064】実施例10 CRH領域の活性測定

このCRH領域のリガンド結合能は実施例5と同様に測定できる。該CRH領域蛋白質のリガンドG-CSFに対する結合の解離定数は、Ig-CRH領域の低結合活性と同様、約2.5nMであった(図4)。これはBNDメインの結合活性よりも10倍強い結合活性であることを示している。また、この値は、プラスミッドpBOSΔIgにより、動物細胞を用いて行った発現で得られた物質のリガンド結合活性(福永らEMBO, J. 前掲)とほぼ同様であった。

【0065】さらに、ゲル濾過HPLCによって、CRH-G-CSF複合体の大きさを実施例6と同様に測定した。その結果を図5に示す。図5からCRH領域は29キログルトンであり、G-CSFは19キログルトンである。複合体は40キログルトンに溶出される。以上の結果より、CRH領域はリガンドと1:1の量比の結合を示し、CRH領域のみではIg-CRH領域の場合の四量体化というような多量体化は起こらなかった。

【0066】

【発明の効果】以上述べたように、本発明はG-CSF受容体のリガンド結合領域の内、CRH領域およびIg-CRH領域の蛋白質をコードするDNAを含有する発*

* 現ベクターを構築し、該ベクターで昆虫細胞を形質転換し、得られた形質転換体を培養して培養液中に分泌された発現生成物を回収することにより、組換えCRH領域蛋白質およびIg-CRH領域蛋白質を製造する方法を新しく確立したものである。本発明により得られた組換え蛋白質は、従来のBNに比べて、リガンドであるG-CSFに対して高い結合活性を保持し、特にIg-CRH領域は、天然のG-CSF受容体と同じリガンド結合能力を保持しつつ、多量体化能を有している。しかも、本発明によれば、天然物からの抽出法で得られる同領域蛋白質に通常伴っている不純物を含まず、高純度の標品を大量に得ることが可能であり、顆粒球増殖に起因する白血病の治療や、さらには、G-CSFに置き換え得るアゴニスト、アンタゴニスト等の医薬の開発および/または研究に大いに寄与することができる。

【0067】

【配列表】

【0068】配列番号: 1

配列の長さ: 1002

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: cDNA to mRNA

起源

生物名: Mouse

細胞の種類: NFS-60

配列

ATG GTA GGG CTG GGA GCC TGC ACC CTG ACT GGA GTT ACC CTG ATC TTC	48
Met Val Gly Leu Gly Ala Cys Thr Leu Thr Gly Val Thr Leu Ile Phe	
1 5 10 15	
TTG CTA CTC CCC AGA AGT CTG GAG AGC TGT GGA CAC ATC GAG ATT TCA	96
Leu Leu Leu Pro Arg Ser Leu Glu Ser Cys Gly His Ile Glu Ile Ser	
20 25 30	
CCC CCT GTT GTC CGC CTG GGG GAC CCT GTC CTG GCC TCT TGC ACC ATC	144
Pro Pro Val Val Arg Leu Gly Asp Pro Val Leu Ala Ser Cys Thr Ile	
35 40 45	
AGC CCA AAC TGC AGC AAA CTG GAC CAA CAG GCA AAG ATC TTA TGG AGA	192
Ser Pro Asn Cys Ser Lys Leu Asp Gln Gln Ala Lys Ile Leu Trp Arg	
50 55 60	
CTG CAA GAT GAG CCC ATC CAA CCT GGG GAC AGA CAG CAT CAT CTG CCT	240
Leu Gln Asp Glu Pro Ile Gln Pro Gly Asp Arg Gln His His Leu Pro	
65 70 75 80	
GAT GGG ACC CAA GAG TCC CTC ATC ACT CTG CCT CAC TTG AAC TAC ACC	288
Asp Gly Thr Gln Glu Ser Leu Ile Thr Leu Pro His Leu Asn Tyr Thr	
85 90 95	
CAG GCC TTC CTC TTC TGC TTA GTG CCA TGG GAA GAC AGC GTC CAA CTC	336
Gln Ala Phe Leu Phe Cys Leu Val Pro Trp Glu Asp Ser Val Gln Leu	
100 105 110	
CTG GAT CAA GCT GAG CTT CAC GCA GGC TAT CCC CCT GCC AGC CCC TCA	384
Leu Asp Gln Ala Glu Leu His Ala Gly Tyr Pro Pro Ala Ser Pro Ser	

21																22	
115					120					125							
AAC	CTA	TCC	TGC	CTC	ATG	CAC	CTC	ACC	ACC	AAC	AGC	CTG	GTC	TGC	CAG	432	
Asn	Leu	Ser	Cys	Leu	Met	His	Leu	Thr	Thr	Asn	Ser	Leu	Val	Cys	Gln		
130					135					140							
TGG	GAG	CCA	GGT	CCT	GAG	ACC	CAC	CTG	CCC	ACC	AGC	TTC	ATC	CTA	AAG	480	
Trp	Glu	Pro	Gly	Pro	Glu	Thr	His	Leu	Pro	Thr	Ser	Phe	Ile	Leu	Lys		
145					150					155					160		
AGC	TTC	AGG	AGC	CGC	GCC	GAC	TGT	CAG	TAC	CAA	GGG	GAC	ACC	ATC	CCG	528	
Ser	Phe	Arg	Ser	Arg	Ala	Asp	Cys	Gln	Tyr	Gln	Gly	Asp	Thr	Ile	Pro		
165					170					175							
GAT	TGT	GTG	GCA	AAG	AAG	AGG	CAG	AAC	AAC	TGC	TCC	ATC	CCC	CGA	AAA	576	
Asp	Cys	Val	Ala	Lys	Lys	Arg	Gln	Asn	Asn	Cys	Ser	Ile	Pro	Arg	Lys		
180					185					190							
AAC	TTG	CTC	CTG	TAC	CAG	TAT	ATG	GCC	ATC	TGG	GTG	CAA	GCA	GAG	AAT	624	
Asn	Leu	Leu	Leu	Tyr	Gln	Tyr	Met	Ala	Ile	Trp	Val	Gln	Ala	Glu	Asn		
195					200					205							
ATG	CTA	GGG	TCC	AGC	GAG	TCC	CCA	AAG	CTG	TGC	CTC	GAC	CCC	ATG	GAT	672	
Met	Leu	Gly	Ser	Ser	Glu	Ser	Pro	Lys	Leu	Cys	Leu	Asp	Pro	Met	Asp		
210					215					220							
GTT	GTG	AAA	TTG	GAG	CCT	CCC	ATG	CTG	CAG	GCC	CTG	GAC	ATT	GGC	CCT	720	
Val	Val	Lys	Leu	Glu	Pro	Pro	Met	Leu	Gln	Ala	Leu	Asp	Ile	Gly	Pro		
225					230					235					240		
GAT	GTA	GTC	TCT	CAC	CAG	CCT	GGC	TGC	CTG	TGG	CTG	AGC	TGG	AAG	CCA	768	
Asp	Val	Val	Ser	His	Gln	Pro	Gly	Cys	Leu	Trp	Leu	Ser	Trp	Lys	Pro		
245					250					255							
TGG	AAG	CCC	AGT	GAG	TAC	ATG	GAA	CAG	GAG	TGT	GAA	CTT	CGC	TAC	CAG	816	
Trp	Lys	Pro	Ser	Glu	Tyr	Met	Glu	Gln	Glu	Cys	Glu	Leu	Arg	Tyr	Gln		
260					265					270							
CCA	CAG	CTC	AAA	GGA	GCC	AAC	TGG	ACT	CTG	GTG	TTC	CAC	CTG	CCT	TCC	864	
Pro	Gln	Leu	Lys	Gly	Ala	Asn	Trp	Thr	Leu	Val	Phe	His	Leu	Pro	Ser		
275					280					285							
AGC	AAG	GAC	CAG	TTT	GAG	CTC	TGC	GGG	CTC	CAT	CAG	GCC	CCA	GTC	TAC	912	
Ser	Lys	Asp	Gln	Phe	Glu	Leu	Cys	Gly	Leu	His	Gln	Ala	Pro	Val	Tyr		
290					295					300							
ACC	CTA	CAG	ATG	CGA	TGC	ATT	CGC	TCA	TCT	CTG	CCT	GGA	TTC	TGG	AGC	960	
Thr	Leu	Gln	Met	Arg	Cys	Ile	Arg	Ser	Ser	Leu	Pro	Gly	Phe	Trp	Ser		
305					310					315					320		
CCC	TGG	AGC	CCC	GGC	CTG	CAG	CTG	AGG	CCT	ACC	ATG	AAG	GCC			1002	
Pro	Trp	Ser	Pro	Gly	Leu	Gln	Leu	Arg	Pro	Thr	Met	Lys	Ala				
325					330												

【0069】配列番号：2

配列の長さ：999

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：Homo sapiens (ヒト)

組織の種類：胎盤またはU937

*

配列

ATG	GCA	AGG	CTG	GGA	AAC	TGC	AGC	CTG	ACT	TGG	GCT	GCC	CTG	ATC	ATC	48
Met	Ala	Arg	Leu	Gly	Asn	Cys	Ser	Leu	Thr	Trp	Ala	Ala	Leu	Ile	Ile	
1				5					10					15		
CTG	CTG	CTC	CCC	GGA	AGT	CTG	GAG	GAG	TGC	GGG	CAC	ATC	AGT	GTC	TCA	96

23	Leu	Leu	Leu	Pro	Gly	Ser	Leu	Glu	Glu	Cys	Gly	His	Ile	Ser	Val	Ser	24
				20					25						30		
	GCC	CCC	ATC	GTC	CAC	CTG	GGG	GAT	CCC	ATC	ACA	GCC	TCC	TGC	ATC	ATC	144
	Ala	Pro	Ile	Val	His	Leu	Gly	Asp	Pro	Ile	Thr	Ala	Ser	Cys	Ile	Ile	
			35					40						45			
	AAG	CAG	AAC	TGC	AGC	CAT	CTG	GAC	CCG	GAG	CCA	CAG	ATT	CTG	TGG	AGA	192
	Lys	Gln	Asn	Cys	Ser	His	Leu	Asp	Pro	Glu	Pro	Gln	Ile	Leu	Trp	Arg	
			50					55					60				
	CTG	GGA	GCA	GAG	CTT	CAG	CCC	GGG	GGC	AGG	CAG	CAG	CGT	CTG	TCT	GAT	240
	Leu	Gly	Ala	Glu	Leu	Gln	Pro	Gly	Gly	Arg	Gln	Gln	Arg	Leu	Ser	Asp	
			65			70				75					80		
	GGG	ACC	CAG	GAA	TCT	ATC	ATC	ACC	CTG	CCC	CAC	CTC	AAC	CAC	ACT	CAG	288
	Gly	Thr	Gln	Glu	Ser	Ile	Ile	Thr	Leu	Pro	His	Leu	Asn	His	Thr	Gln	
					85					90					95		
	GCC	TTT	CTC	TCC	TGC	TGC	CTG	AAC	TGG	GGC	AAC	AGC	CTG	CAG	ATC	CTG	336
	Ala	Phe	Leu	Ser	Cys	Cys	Leu	Asn	Trp	Gly	Asn	Ser	Leu	Gln	Ile	Leu	
				100					105					110			
	GAC	CAG	GTT	GAG	CTG	CGC	GCA	GGC	TAC	CCT	CCA	GCC	ATA	CCC	CAC	AAC	384
	Asp	Gln	Val	Glu	Leu	Arg	Ala	Gly	Tyr	Pro	Pro	Ala	Ile	Pro	His	Asn	
				115				120						125			
	CTC	TCC	TGC	CTC	ATG	AAC	CTC	ACA	ACC	AGC	AGC	CTC	ATC	TGC	CAG	TGG	432
	Leu	Ser	Cys	Leu	Met	Asn	Leu	Thr	Thr	Ser	Ser	Leu	Ile	Cys	Gln	Trp	
				130				135						140			
	GAG	CCA	GGA	CCT	GAG	ACC	CAC	CTA	CCC	ACC	AGC	TTC	ACT	CTG	AAG	AGT	480
	Glu	Pro	Gly	Pro	Glu	Thr	His	Leu	Pro	Thr	Ser	Phe	Thr	Leu	Lys	Ser	
				145			150				155				160		
	TTC	AAG	AGC	CGG	GGC	AAC	TGT	CAG	ACC	CAA	GGG	GAC	TCC	ATC	CTG	GAC	528
	Phe	Lys	Ser	Arg	Gly	Asn	Cys	Gln	Thr	Gln	Gly	Asp	Ser	Ile	Leu	Asp	
				165					170					175			
	TGC	GTG	CCC	AAG	GAC	GGG	CAG	AGC	CAC	TGC	TGC	ATC	CCA	CGC	AAA	CAC	576
	Cys	Val	Pro	Lys	Asp	Gly	Gln	Ser	His	Cys	Cys	Ile	Pro	Arg	Lys	His	
				180					185					190			
	CTG	CTG	TTG	TAC	CAG	AAT	ATG	GGC	ATC	TGG	GTG	CAG	GCA	GAG	AAT	GCG	624
	Leu	Leu	Leu	Tyr	Gln	Asn	Met	Gly	Ile	Trp	Val	Gln	Ala	Glu	Asn	Ala	
				195				200						205			
	CTG	GGG	ACC	AGC	ATG	TCC	CCA	CAA	CTG	TGT	CTT	GAT	CCC	ATG	GAT	GTT	672
	Leu	Gly	Thr	Ser	Met	Ser	Pro	Gln	Leu	Cys	Leu	Asp	Pro	Met	Asp	Val	
				210				215						220			
	GTG	AAA	CTG	GAG	CCC	CCC	ATG	CTG	CGG	ACC	ATG	GAC	CCC	AGC	CCT	GAA	720
	Val	Lys	Leu	Glu	Pro	Pro	Met	Leu	Arg	Thr	Met	Asp	Pro	Ser	Pro	Glu	
				225			230				235				240		
	GCG	GCC	CCT	CCC	CAG	GCA	GGC	TGC	CTA	CAG	CTG	TGC	TGG	GAG	CCA	TGG	768
	Ala	Ala	Pro	Pro	Gln	Ala	Gly	Cys	Leu	Gln	Leu	Cys	Trp	Glu	Pro	Trp	
				245					250					255			
	CAG	CCA	GGC	CTG	CAC	ATA	AAT	CAG	AAG	TGT	GAG	CTG	CGC	CAC	AAG	CCG	816
	Gln	Pro	Gly	Leu	His	Ile	Asn	Gln	Lys	Cys	Glu	Leu	Arg	His	Lys	Pro	
				260				265						270			
	CAG	CGT	GGA	GAA	GCC	AGC	TGG	GCA	CTG	GTG	GGC	CCC	CTC	CCC	TTG	GAG	864
	Gln	Arg	Gly	Glu	Ala	Ser	Trp	Ala	Leu	Val	Gly	Pro	Leu	Pro	Leu	Glu	
				275				280						285			

25

26

GCC CTT CAG TAT GAG CTC TGC GGG CTC CTC CCA GCC ACG GCC TAC ACC 912
 Ala Leu Gln Tyr Glu Leu Cys Gly Leu Leu Pro Ala Thr Ala Tyr Thr
 290 295 300
 CTG CAG ATA CGC TGC ATC CGC TGG CCC CTG CCT GGC CAC TGG AGC GAC 960
 Leu Gln Ile Arg Cys Ile Arg Trp Pro Leu Pro Gly His Trp Ser Asp
 305 310 315 320
 TGG AGC CCC AGC CTG GAG CTG AGA ACT ACC GAA CGG GCC 999
 Trp Ser Pro Ser Leu Glu Leu Arg Thr Thr Glu Arg Ala
 325 330

【0070】配列番号：3

配列の長さ：28

配列の型：核酸

* 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：合成DNA

配列

CGGGATCCAT GGTAGGGCTG GGAGCCTG

28

【0071】配列番号：4

配列の長さ：31

配列の型：核酸

※ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：合成DNA

配列

CGGGATCCTT AGGCCTTCAT GGTAGGCCTC A

31

【0072】配列番号：5

配列の長さ：765

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：cDNA to mRNA

起源

生物名：Mouse

細胞の種類：NFS-60

★

配列

ATG GTA GGG CTG GGA GCC TGC ACC CTG ACT GGA GTT ACC CTG ATC TTC 48
 Met Val Gly Leu Gly Ala Cys Thr Leu Thr Gly Val Thr Leu Ile Phe
 1 5 10 15
 TTG CTA CTC CCC AGA AGT CTG GAG AGC TCT GGA CAC ATC GGC GTC CAA 96
 Leu Leu Leu Pro Arg Ser Leu Glu Ser Ser Gly His Ile Gly Val Gln
 20 25 30
 CTC CTG GAT CAA GCT GAG CTT CAC GCA GGC TAT CCC CCT GCC AGC CCC 144
 Leu Leu Asp Gln Ala Glu Leu His Ala Gly Tyr Pro Pro Ala Ser Pro
 35 40 45
 TCA AAC CTA TCC TGC CTC ATG CAC CTC ACC ACC AAC AGC CTG GTC TGC 192
 Ser Asn Leu Ser Cys Leu Met His Leu Thr Thr Asn Ser Leu Val Cys
 50 55 60
 CAG TGG GAG CCA GGT CCT GAG ACC CAC CTG CCC ACC AGC TTC ATC CTA 240
 Gln Trp Glu Pro Gly Pro Glu Thr His Leu Pro Thr Ser Phe Ile Leu
 65 70 75 80
 AAG AGC TTC AGG AGC CGC GCC GAC TGT CAG TAC CAA GGG GAC ACC ATC 288
 Lys Ser Phe Arg Ser Arg Ala Asp Cys Gln Tyr Gln Gly Asp Thr Ile
 85 90 95
 CCG GAT TGT GTG GCA AAG AAG AGG CAG AAC AAC TGC TCC ATC CCC CGA 336
 Pro Asp Cys Val Ala Lys Lys Arg Gln Asn Asn Cys Ser Ile Pro Arg
 100 105 110
 AAA AAC TTG CTC CTG TAC CAG TAT ATG GCC ATC TGG GTG CAA GCA GAG 384
 Lys Asn Leu Leu Leu Tyr Gln Tyr Met Ala Ile Trp Val Gln Ala Glu
 115 120 125
 AAT ATG CTA GGG TCC AGC GAG TCC CCA AAG CTG TGC CTC GAC CCC ATG 432

27

28

Asn Met Leu Gly Ser Ser Glu Ser Pro Lys Leu Cys Leu Asp Pro Met
 130 135 140
 GAT GTT GTG AAA TTG GAG CCT CCC ATG CTG CAG GCC CTG GAC ATT GGC 480
 Asp Val Val Lys Leu Glu Pro Pro Met Leu Gln Ala Leu Asp Ile Gly
 145 150 155 160
 CCT GAT GTA GTC TCT CAC CAG CCT GGC TGC CTG TGG CTG AGC TGG AAG 528
 Pro Asp Val Val Ser His Gln Pro Gly Cys Leu Trp Leu Ser Trp Lys
 165 170 175
 CCA TGG AAG CCC AGT GAG TAC ATG GAA CAG GAG TGT GAA CTT CGC TAC 576
 Pro Trp Lys Pro Ser Glu Tyr Met Glu Gln Glu Cys Glu Leu Arg Tyr
 180 185 190
 CAG CCA CAG CTC AAA GGA GCC AAC TGG ACT CTG GTG TTC CAC CTG CCT 624
 Gln Pro Gln Leu Lys Gly Ala Asn Trp Thr Leu Val Phe His Leu Pro
 195 200 205
 TCC AGC AAG GAC CAG TTT GAG CTC TGC GGC CTC CAT CAG GCC CCA GTC 672
 Ser Ser Lys Asp Gln Phe Glu Leu Cys Gly Leu His Gln Ala Pro Val
 210 215 220
 TAC ACC CTA CAG ATG CGA TGC ATT CGC TCA TCT CTG CCT GGA TTC TGG 720
 Tyr Thr Leu Gln Met Arg Cys Ile Arg Ser Ser Leu Pro Gly Phe Trp
 225 230 235 240
 AGC CCC TGG AGC CCC GGC CTG CAG CTG AGG CCT ACC ATG AAG GCC 765
 Ser Pro Trp Ser Pro Gly Leu Gln Leu Arg Pro Thr Met Lys Ala
 245 250

【0073】配列番号：6

配列の長さ：28

配列の型：核酸

* 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：合成DNA

配列

CGGGATCCAT GGTAGGCCTG GGAGCCTG

28

【0074】配列番号：7

配列の長さ：39

配列の型：核酸

※ 鎖の数：一本鎖

30 トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：合成DNA

配列

GGACGCCGAT GTGTCCAGAG CTCTCCAGAC TTCTGGGGA

39

【0075】配列番号：8

配列の長さ：36

配列の型：核酸

★ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：合成DNA

配列

CTGGAGAGCT CTGGACACAT CGGCGTCCAA CTCCTG

36

【0076】配列番号：9

配列の長さ：31

配列の型：核酸

☆ 鎖の数：一本鎖

40 トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：合成DNA

配列

GCTCTAGATT AGGCCTTCAT GGTAGGCCTC A

31

【図面の簡単な説明】

【図1】 G-C S F受容体のリガンド結合領域の、C R H領域蛋白質、およびI g-C R H領域蛋白質を昆虫細胞で発現させるための組換え型バキュロウイルスAc C R HおよびAc I g-C R Hの構築模式図である。

【図2】 バキュロウイルス系により発現されたI g-C R H領域蛋白質のG-C S Fとの結合活性を示す、ス

キャッチャード分析の結果の模写図である。

【図3】 ゲル濾過H P L CにおけるI g-C R H・G-C S F複合体の溶出パターン模写図である。

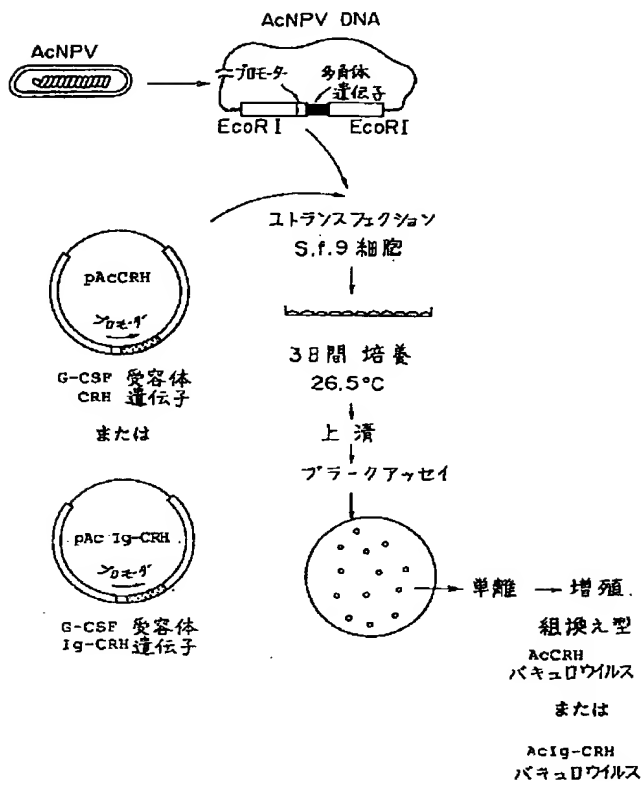
【図4】 バキュロウイルス系により発現されたC R H領域蛋白質のG-C S Fとの結合活性を示す、スキャッチャード分析の結果の模写図である。

【図5】 ゲル濾過H P L CにおけるC R H・G-C S

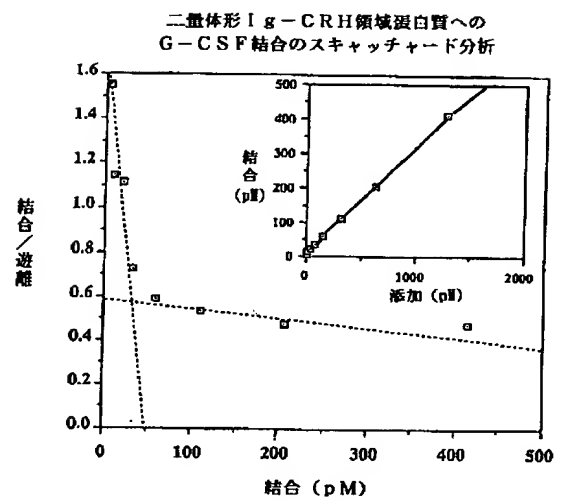
50

F 複合体の溶出パターンの模写図である。

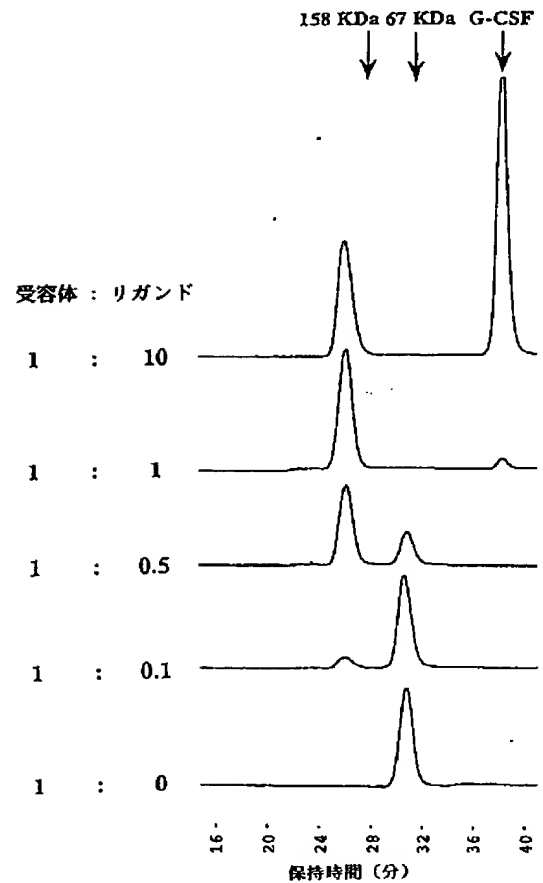
【図 1】



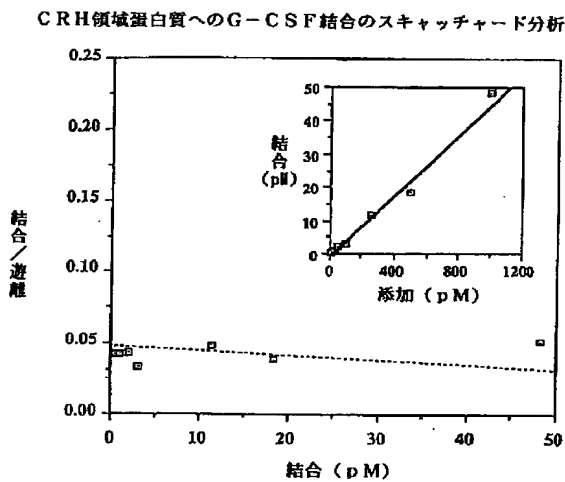
【図 2】



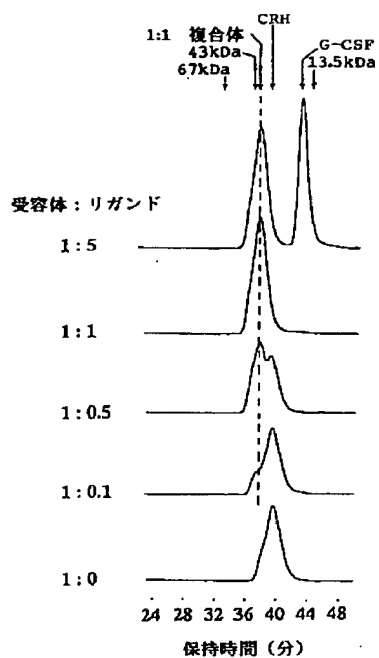
【図 3】



【図 4】



【図 5】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶

C 1 2 N 5/10

C 1 2 P 21/02

// (C 1 2 N 5/10

C 1 2 R 1:91)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:91)

識別記号

片内整理番号

F I

技術表示箇所

C 9282-4B

(C 1 2 N 5/00

C 1 2 R 1:91)

B